STRESSUL OXIDATIV ÎN SCLEROZA LATERALĂ AMIOTROFICĂ: MECANISM PATOGENIC SAU EPIFENOMEN?

N. Cârciumaru[1], Irene Damian[2]

[1] Catedra de neurologie, Facultatea de Medicină „Ovidius" Constanţa, [2] Spitalul Clinic de Urgenţă Constanţa

Rezumat

Speciile de oxigen reactive (ROS) sunt generate în multe reacţii de oxidare biologică. ROS pot induce leziuni celulare letale prin oxidarea şi peroxidarea proteinelor, lipidelor şi a acizilor nucleici. Acest proces pare a contribui într-o multitudine de alte procese, cum ar fi îmbătrânirea, moartea celulară ischemică şi bolile neurodegenerative.

Leziuni induse de oxidare au fost evidenţiate în scleroza laterală amiotrofică familială şi sporadică şi la şoarecii mutanţi care supraexprimau o genă mutantă SOD_1. Mecanismul acestor leziuni şi semnificaţia lor patogenică rămân însă neclare.

Cuvinte cheie: stress oxidativ; scleroză laterală amiotrofică

Abstract

Reactive oxygen species are generated in many biological oxidation reactions; they can induce lethal cellular damage through oxidation and peroxidation of proteins, lipids and nucleic acids. This process is thought to contribute to a variety of processes such as aging, ischemic cell death and neurodegenerative diseases.

Oxidation-induced lesions have been demonstrated in human sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis and in transgenic mice overexpressing a mutant SOD1 gene. The mechanism of this damage and its pathogenic significance remain unclear.

Key words: oxidative stress; amyotrophic lateral sclerosis

Atunci când rata de generare a ROS, prin reacţiile de oxidare biologică, depăşeşte capacitatea de neutralizare a acestora de către mecanismele celulare, datorită creşterii producerii ROS sau pierderii sistemului celular de apărare anti-oxidantă, rezultă stressul oxidativ. Din acest motiv, celulele şi ţesuturile sunt prevăzute cu sisteme de apărare împotriva oxidării; variate sisteme enzimatice (de exemplu: SOD, catalaza şi glutation peroxidaza) convertesc ROS în molecule mai inofensive, iar compuşi precum vitamina C şi vitamina E sunt neutralizanţi ai ROS.

DOVEZI ALE GENERĂRII CRESCUTE DE ROS ÎN SCLEROZA LATERALĂ AMIOTROFICĂ (SLA)

Mutaţii ale genei SOD_1 de pe cromozomul 21 sunt prezente în aproximativ 15-20% din familiile cu SLA. Această genă codează SOD cupru–zinc dependentă citosolică, o enzimă care acţionează ca un homodimer şi converteşte anionii superoxid în peroxid de hidrogen, care este ulterior metabolizat de glutation reductază şi catalază. Aceste date sugerează că SOD_1 mutantă dobândeşte o nouă activitate citosolică; această nouă funcţie implică probabil stressul oxidativ, drept un proces fiziopatologic esenţial.

O explicaţie posibilă este aceea că mutaţia afectează conformaţia proteică a SOD_1, astfel încât cuprul din centrul activ al enzimei mutante devine accesibil pentru alte substraturi decât superoxidul (cum ar fi peroxidul de hidrogen şi peroxinitritul). În câteva studii biochimice (dar nu în toate) SOD_1 mutantă s-a dovedit a avea o activitate peroxidazică crescută, prin care enzima converteşte peroxidul de hidrogen în radicali hidroxil toxici. Enzima mutantă ar deveni astfel o sursă de ROS. S-a dovedit dificil a demonstra o astfel de activitate generatoare de ROS în celulele intacte. Celulele PC12 în care au fost transduse mutaţiile SOD_1 de tip A4V şi V148G au dovedit o producţie crescută de superoxid când au fost puse într-un mediu bogat în peroxid de hidrogen. In vivo, Bogdanov şi colaboratorii (1998) au reuşit să demonstreze o producţie crescută de radicali liberi la nivel cerebral şi medular la şoarecii cu mutaţia G93A a SOD_1. Această anormalitate apărea înaintea instalării pierderii de neuroni motori, ceea ce pledează pentru contribuţia radicalilor oxidanţi la degenerarea neuronilor motori. Bruijn şi colaboratorii (1999) nu au găsit însă modificări similare la şoarecii cu mutaţia G37R a SOD_1.

Pe de altă parte Beckman şi colaboratorii (2000) au sugerat că SOD_1 mutantă devine mai accesibilă pentru

peroxinitrat, pe care îl transformă în ioni de nitroniu (care rezultă din reacţia dintre oxidul nitric şi superoxid). Ionii de nitroniu pot nitrozila reziduurile de tirozină, lezând oxidativ proteinele. O afinitate scăzută pentru zinc, ducând la pierderea acestui metal din SOD_1 mutantă, a fost semnalată a creşte activitatea generatoare de nitroniu.

În sprijinul acestei ipoteze vin studiile care au demonstrat prezenţa nitrotirozinei în măduva şoarecilor mutanţi SOD_1-G93A şi SOD_1-G37R şi în ţesuturile post mortem ale cazurilor de SLA familială cu mutaţii ale genei SOD_1, folosind metode analitice şi imunocitochimice. Interesant este că modificări similare au fost observate şi în SLA sporadică, la nivelul măduvei.

Studii biochimice au sugerat că neurofilamentele (şi mai ales neurofilamentele L) sunt ţinte ale nitrozilării, dar nu au fost aduse până în prezent dovezi certe ale prezenţei neurofilamentelor nitrozilate la şoareci sau la pacienţii umani cu SLA.

Trebuie menţionat că nitrotirozina a fost semnalată şi în formă nelegată de proteine, dar semnificaţia prezenţei nitrotirozinei libere este încă incertă. Este posibil ca proteinele nitrozilate să fie rapid degradate intracelular, astfel încât să scape detecţiei.

Dacă conversia peroxinitratului în ioni nitroniu, catalizată de SOD_1 mutantă, are un rol în patologia SLA, expresia sintetazei oxidului nitric (NOS) capătă de asemenea importanţă fiziopatologică. Rolul acestei enzime în degenerarea neuronului motor a fost sugerat de colocalizarea sintetazei inductibile a oxidului nitric (i-NOS) cu SOD_1 în incluziile din neuronii motori. Allen şi colaboratorii (2003) au semnalat prezenţa fenomenului de „up regulation" a i-NOS în măduva şoarecilor cu mutaţia SOD_1-G93A, la care există de asemenea o marcată proliferare glială şi microglială. Deoarece aceste modificări apar numai după debutul semnelor clinice, autorii sugerează un rol patogenetic secundar al NOS.

La şoarecii transgenici SOD_1-G93A răspunsul fiziologic post-axonotomia neuronilor motori din nervul facial (reprezentat de inducerea expresiei NOS) s-a dovedit mult mai slab decât la lotul martor, iar pierderea de neuroni motori mult mai mare, ceea ce indică vulnerabilitatea crescută a neuronilor motori SOD_1 mutanţi la stressul oxidativ (declanşat în acest caz de axonotomie) (5).

Eliminarea expresiei NOS neuronale la şoarecii mutanţi SOD_1-G93A prin încrucişarea cu şoareci defectivi pentru NOS neuronală (n NOS) nu a afectat cursul bolii. O anumită activitate reziduală a n-NOS pare să persiste totuşi la şoarecii n-NOS defectivi datorită prezenţei unor produşi ai NOS; deoarece aceşti şoareci n-NOS defectivi s-au dovedit rezistenţi la alte agresiuni dependente de oxidul nitric, autorii studiului respectiv consideră că activitatea reziduală a n-NOS nu explică fenomenele constatate (6).

Rolul posibil al oxidului nitric a fost explorat în câteva studii farmacologice. Tratarea şoarecilor mutanţi SOD_1-G93A cu inhibitori nespecifici ai NOS (nitro-L-arginin-metil ester = L-NAME), cu inhibitori relativ selectivi ai n-NOS (f-nitroindazol) şi inhibitori înalt selectivi ai n-NOS (AR-R7338 şi AR-R18512) nu a afectat durata sau debutul bolii; doar inhibitorul selectiv al n-NOS AR-R17477 a prelungit cu puţin supravieţuirea şoarecilor mutanţi SOD_1 -G93A (2).

Un studiu deosebit de relevant asupra rolului peroxidazei sau activităţii SOD_1 mutante asupra peroxinitratului a fost realizat de Gurney şi colaboratorii (1998); aceştia au manipulat conţinutul celular în SOD_1 „sălbatică" (wt SOD_1) prin eliminarea sau creşterea expresiei SOD_1 wt la şoarecii mutanţi SOD_1-G85R. Acest fapt nu a influenţat debutul sau evoluţia bolii neuronului motor. Autorii au concluzionat că este imposibil ca superoxidul sau peroxinitratul să fie factori patogenici. Totuşi, trebuie remarcat faptul că şi atunci când wt SOD_1 a fost eliminată, peroxidul de hidrogen generat prin alte procese intracelulare poate fi suficient pentru a genera stress oxidativ.

Aceiaşi autori au raportat o prezenţă a agregatelor conţinând SOD_1 mutantă în neuronii motori ai şoarecilor cu mutaţii ale SOD_1-G37R, G85R şi G93A, precum şi în astrocitele şoarecilor cu mutaţia SOD_1-G37R, ca şi în cazurile de SLA familială cu mutaţii ale SOD_1 la om. De aceea, o tendinţă anormală la agregare poate explica rolul citotoxic al SOD_1 mutante; această supoziţie e susţinută şi de faptul că SOD_1 mutantă supraexprimată în culturi de neuroni motori, după injectarea intramusculară de gene mutante pentru SOD_1 G41R şi N139K, formează agregate într-o manieră dependentă de receptorul pentru glutamat şi de calciu.

Formarea de agregate de SOD_1 mutantă în neuronul motor nu exclude un rol cheie al stressului oxidativ în degenerarea neuronului motor indusă de proteina mutantă. Stressul oxidativ ar putea iniţia sau favoriza agregarea SOD_1 mutante, iar agregatele ar putea induce neurotoxicitatea prin generarea de ROS.

Dacă afinitatea SOD_1 mutante pentru zinc şi cupru e scăzută, un exces relativ al acestor metale ar putea rezulta, ducând la o toxicitate prin formarea de radicali liberi. O afinitate scăzută pentru zinc a SOD_1 mutante a fost semnalată, dar majoritatea moleculelor de SOD_1 mutantă par a avea o afinitate normală pentru cupru; mai mult, nu au fost obiectivate creşteri ale nivelului cuprului sau zincului în fibroblaştii pacienţilor cu SLA familială legată de mutaţia SOD_1.

Dovezi indirecte despre implicarea cuprului sunt aduse de observaţia că tratarea celulelor PC12 cu D-penicilamină (un chelator de cupru) atenuează moartea celulară indusă de SOD_1 mutantă V146G introdusă în aceste celule printr-un vector viral. Tratarea şoarecilor trangenici SOD_1-G93A cu D-penicilamină a întârziat debutul bolii şi a prelungit supravieţuirea. Ipoteza că aceste beneficii in vitro şi in vivo se datorează proprietăţilor chelatoare de cupru ale D-penicilaminei e sugerată de faptul că drogul neutralizează efectul pro-apoptotic al SOD_1 mutante A4V şi G93A în liniile celulare neuronale şi inhibă activitatea peroxidazică crescută a enzimei mutante (8).

Timpul de semiviaţă al SOD_1 în neuronii motori este mai mare decât în oricare alt tip de celule, ceea ce ar creşte susceptibilitatea acestora la degradarea oxidativă, accentuată de deficienţa în zinc a SOD_1 sălbatice sau de

mutaţiile SOD_1 mai ales prin oxidarea selectivă a reziduurilor de histidină, care leagă ionii metalici în situsul activ al enzimei; în final, se produce agregarea enzimei mutante (9).

Tiwari şi colaboratorii (2003) au evidenţiat o sensibilitate crescută a 14 tipuri de SOD_1 mutante la acţiunea reducătoare a disulfidului în condiţii de pH şi temperatură similare celor intracelulare, sugerând implicarea acestui mecanism în neurotoxicitatea SOD_1 mutante.

DOVEZI ALE LEZIUNILOR INDUSE DE OXIDARE ÎN SLA

Câteva studii au raportat alterări prin oxidare a ADN-ului, lipidelor şi proteinelor precum şi o sensibilitate crescută la stressul oxidativ a celulelor conţinând SOD_1 mutante, fără a putea fi descrisă originea sau mecanismul acestora. S-au semnalat nivele crescute de 8-hidroxi-2-deoxiguanozina (un indicator al modificării induse de oxidare asupra acizilor nucleici) la nivel medular la pacienţii cu SLA sporadică şi familială asociată sau nu cu mutaţii ale SOD_1 (11). S-a studiat de asemenea activarea sistemelor de refacere a ADN-ului alterat în aceste cazuri.

Tratarea liniei NSC34 de celule neuronale motorii cu peroxid de hidrogen sau perxinitrat duce la moarte celulară asociată cu activarea poli ADP-riboză polimerazei (PARP), care duce la depleţia de nicotin-amid adenin dinucleotid şi ATP. Inhibitori ai PARP produc o atenuare a distrugerii neuronilor NSC34 (12).

Kim şi colaboratorii (2003) au observat că expresia PARP este scăzută în neuronii motori spinali şi crescută în astrocite la bolnavii cu SLAS, ceea ce implică stressul oxidativ, alterarea ADN-ului şi leziunile gliale în patogeneza SLA.

La pacienţii cu SLA sporadică s-au raportat mutaţii punctiforme şi o frecvenţă alelică diferită de lotul martor a genei nucleazei APEX; această genă codează APE1, o endonuclează care îndepărtează situsurile apurinice şi apirimidinice. Activitatea şi nivelul acestei enzime s-au dovedit scăzute în ţesutul cerebral al pacienţilor cu SLA sporadică.

Nivele crescute de proteine carbonilate, un indice al degenerării oxidative a proteinelor, au fost evidenţiate în măduva şoarecilor transgenici mutanţi SOD_1-G93A, dar numai în stadii avansate ale bolii. Creşteri similare au fost raportate în cortexul motor sau măduva pacienţilor cu SLA sporadică.

Concentraţii crescute de proteine malondialdehid modificate (indicator al alterării oxidative a lipidelor) s-au pus în evidenţă în neuronii motori ai pacienţilor cu SLA familială sau sporadică, ca şi la şoarecii transgenici mutanţi SOD_1-G93A. Nivelele de malondialdehidă au fost crescute în măduva şoarecilor transgenici mutanţi SOD_1-G93A, dar nu la cei mutanţi SOD_1-G37R şi nici în cortexul motor al pacienţilor cu SLA familială. 4-Hidroxinonenalul (un produs al peroxidării acizilor graşi) a fost găsit în concentraţie crescută în LCR-ul pacienţilor cu SLA sporadică, ca şi un conţinut ridicat în proteine modificate prin 4 hidroxinonenal la nivel medular (14).

Cutler şi colaboratorii (2002) au raportat nivele crescute statistic semnificativ de ceramide, sfingolipide şi esteri de colesterol în măduva pacienţilor cu SLA, cât şi a şoarecilor SOD_1 mutanţi, alături de dovezi biochimice ale unui marcat stress oxidativ, aceste modificări precedând debutul clinic al bolii. Expunerea culturilor de neuroni motori la stressul oxidativ a dus de asemenea la acumulări anormale ale acestor substanţe. Aceste efecte au fost prevenite prin folosirea unui inhibitor al sintezei sfingolipidelor (care generează ceramidele).

Liniile celulare care supraexprimă o genă mutantă SOD_1 sunt cunoscute a prezenta o sensibilitate crescută la stressul oxidativ indus prin privarea de factori de creştere sau substanţe nutritive. În culturi primare de celule nigrale de la şoareci transgenici mutanţi SOD_1-G93A s-a demonstrat creşterea sensibilităţii faţă de stressul oxidativ. Pentru a se evita un posibil efect de eroare al supra-expresiei genei mutante în aceste modele, s-au studiat culturi de fibroblaşti de la pacienţii cu SLA familială asociată cu mutaţii ale SOD_1 (L38V, D90A, G93C), găsindu-se o hipersensibilitate a acestor celule la peroxidul de hidrogen şi 3-morfolinosidnonimină-hidroclorid, dar nu şi la deprivarea de substanţe nutritive sau tratarea cu nitroprusiat. Fibroblaştii de la pacienţii cu SLA sporadică aveau o sensibilitate încă şi mai mare la acest stress oxidativ indus exogen. Un studiu efectuat pe fibroblaşti proveniţi de la pacienţii cu SLA familială neasociată cu mutaţii ale SOD_1 nu a evidenţiat nici o modificare biochimică datorată stressului oxidativ (3).

În concluzie, mai multe studii au demonstrat agresiunea oxidativă în SLA familială asociată cu mutaţii ale SOD_1 cât şi în SLA sporadică, dar nici unul dintre acestea nu a adus dovezi categorice pentru rolul primar al ROS în moartea neuronului motor. Unii autori au afirmat că prezenţa similară a alterărilor oxidative în SLA familială asociată cu mutaţiile SOD_1 şi SLA sporadică, sugerează că SLA sporadică este produsă de o modificare neereditară a SOD_1; totuşi nici o mutaţie exonică a genei SOD_1 nu a fost evidenţiată la cazurile de SLA sporadică (cu excepţia câtorva cazuri denumite „aparent sporadice"), iar activitatea SOD_1 în eritrocite şi cortexul motor s-a dovedit normală la pacienţii cu SLA sporadică. Mutaţii somatice în gena SOD_1 par a fi absente în cortexul motor

Tabelul 1

Dovezi neuro-chimice ale implicării stressului oxidativ în lezarea neuronilor motori în SLA (după Beckman şi colaboratorii, 2000)

- Fibroblaştii bolnavilor cu SLA dovedesc experimental o sensibilitate crescută la stressul oxidativ;
- Creşterea nivelelor proteinelor carbonilate şi a 8-hidroxi-2-dioxiguanozinei în măduva spinării şi cortexul frontal;
- Creşterea ARNm pentru SOD_1 în neuronii motori restanţi;
- Creşterea expresiei metalotioneinei şi a 3-nitrozinei în măduvă;
- Creşterea nivelului seleniului şi a glutation-peroxidazei (enzimă ce conţine seleniu) în măduvă;
- Creşterea expresiei globale a SOD_1, SOD_2 şi a catalazei la nivel medular.

al pacienţilor cu SLA sporadică; totuşi, activitatea SOD_1 în neuronul motor cu vârstă înaintată nu a fost studiată, iar modificările patogenice post-translaţionale ale SOD_1 necesită studii viitoare.

Dovezi indirecte ale stressului oxidativ în SLA provin din observaţia că sistemele enzimatice celulare cu rol în neutralizarea radicalilor liberi sunt supraactivate în această boală. În celulele gliale, s-a evidenţiat imunocitochimic, dar nu şi biochimic, o creştere a SOD_1, SOD_2 şi a catalazei; în ceea ce priveşte glutation peroxidaza, au fost raportate atât o activitate crescută cât şi scăzută (16).

Hemoxigenaza-1 a fost găsită crescută în neuronii motori din SLA familială sau sporadică, dar nu şi la şoarecii transgenici SOD_1-G93A. O creştere a imunoreactivităţii pentru metalotioneine a fost observată la nivel medular în SLA.

Metalotioneinele (MT) constituie o familie de proteine care leagă zincul, ele putând funcţiona drept zinc-chaperonine pentru apo-SOD_1 in vitro. Deleţia genelor MT I şi II (sintetizate de celulele gliale) şi a MT III (prezentă în neuroni) la şoarecii mutanţi G93A-SOD_1 a dus la agravarea deficitului motor, în ceea ce priveşte debutul (MT I şi II) cât şi rata de progresie (MT III). Aceste rezultate demonstrează influenţa MT şi a celulelor non-neuronale asupra evoluţiei bolii în aceste modele animale (17).

Creşterea fiziologică a concentraţiei vitaminei E, legată de vârstă, este absentă în creierul şoarecilor SOD_1-G93A, sugerând că aceştia şi-au epuizat capacitatea antioxidantă a vitaminei E.

EFECTUL AGENŢILOR ANTIOXIDANŢI ASUPRA DISTRUGERII NEURONILOR MOTORI ÎN SLA

Dovezi ale unui rol patologic al stressului oxidativ în moartea neuronului motor din SLA asociată cu mutaţii ale SOD_1 provin şi din studii care au demonstrat un efect al substanţelor antioxidante asupra evoluţiei bolii. Celulele PC12 transduse cu SOD_1 mutante V148G şi A4V au fost cel puţin parţial protejate de substanţele antioxidante împotriva morţii celulare induse de gena mutantă a SOD_1, dar acest efect nu s-a regăsit în culturile de neuroni motori în care SOD_1 mutantă a fost supraexprimată prin injectare intranucleară (18).

Tratamentul cu vitamina E şi seleniu întârzie debutul bolii clinice la şoarecii transgenici SOD_1-G93A, fără a modifica însă evoluţia bolii; un efect similar îl are şi supraexpresia genei Bcl-2, despre care se crede că exercită un efect antiapoptotic prin intermediul unui mecanism antioxidant (19).

S-au făcut puţine studii asupra efectului substanţelor antioxidante în SLA la om: N-acetilcisteina, un antioxidant puternic, a fost evaluat într-un studiu prospectiv dublu orb, placebo controlat, pe 111 pacienţi care au fost trataţi 12 luni cu 50 mg/Kg/zi injectabil subcutanat. Deşi medicamentul nu a dovedit un efect benefic global (Louwerse şi colaboratorii 1995), un efect favorabil asupra duratei supravieţuirii a fost remarcat la 81 de pacienţi cu SLA cu debut la nivelul membrelor.

CORELAŢII ÎNTRE STRESUL OXIDATIV ŞI EXCITOTOXICITATE ÎN SLA

Se acumulează tot mai multe probe asupra rolului primar sau secundar al excitoxicităţii induse de glutamat în patogeneza SLA, precum şi a legăturilor fiziopatologie dintre aceasta şi stresul oxidativ indus de mutaţii ale SOD_1.

Neuronii motori care conţin SOD_1 mutante par a fi mai vulnerabili la excitoxicitate. În studiile anatomopatologice, mitocondriile s-au dovedit a fi prima (sau printre primele) ţinte ale efectului deteriorativ al SOD_1 mutante, ceea ce duce la scăderea producerii de ATP şi creşterea producerii de radicali liberi. Astfel, Menzies şi colaboratorii (2002) au constatat alterări morfologice ale mitocondriilor în neuronii NSC34 care exprimau SOD_1 mutante: edematierea şi defecte de colorare, însoţite de modificări biochimice constând în principal în scăderea activităţii complexelor II şi IV ale lanţului mitocondrial de transfer al electronilor.

Activarea PARP indusă de alterările ADN-ului creşte dificitul de ATP, rezultând o carenţă de energie care blochează funcţia pompelor ionice dependente de ATP care menţin gradientul electrochimic normal al membranei neuronale. Clearence-ul insuficient al ionilor de calciu care pătrund în celulă prin stimularea receptorilor pentru glutamat produce o creştere a concentraţiei citosolice de calciu, care iniţiază o gamă largă de procese enzimatice ce duc în final la moarte celulară. Nivele crescute de calciu citosolic au fost observate în celulele SH–SY5Y transduse cu mutaţia SOD_1-G93A în leucocitele din sângele periferic al pacienţilor cu SLA sporadică. Mici vacuole conţinând calciu au fost evidenţiate în neuronii motori spinali ai şoarecilor mutanţi SOD_1-G93A, iar o creştere a calciului intracelular a fost demonstrată în teminaţiile motorii la pacienţii cu SLA sporadică (12).

Alterarea indusă de mutaţiile SOD_1 poate duce la o stimulare glutamatergică excesivă, datorită unui clearence insuficient al glutamatului din spaţiul extracelular de către transportorul glial de glutamat (EAAT2). Pierderea EAAT2 a fost observată în ţesuturile post-mortem ale pacienţilor cu SLA şi în măduva şoarecilor mutanţi SOD_1-G85R, scădere atribuită alterărilor oxidative produse de mutaţiile SOD_1. EAAT2 este în mod particular sensibil la stressul oxidativ şi studiile prin imunoprecipitare au arătat că EAAT2 este una dintre proteinele alterate oxidativ de către 4-hidroxinonenal.

Dovezi mai directe sunt aduse de un studiu recent (22) care a demonstrat că SOD_1 mutante afectează direct transportul glutamatului de către EAAT2 printr-un efect pe capătul C-terminal al acestei proteine. Aceste date sugerează că stressul oxidativ duce la formarea unor intermediari toxici (cum ar fi 4-hidroxinonenal) care afectează transportul glutamatului şi induce, în mod secundar, degenerarea excitotoxică a neuronului motor şi formarea agregatelor de SOD_1 mutante observate în culturile de neuroni motori injectate cu SOD_1 mutante. Aceste procese par a fi dependente de influxul de calciu determinat de stimularea glutamatergică, furnizând altă cale de legătură între cele două mecanisme.

Rao şi colaboratorii (2002) aduc dovezi ale interacţiunii dintre neuronii motori şi celulele gliale în cadrul procesului patogenic din SLA; astfel, în culturile de neuroni motori ROS induşi prin acţiunea glutamatului s-au dovedit capabili a părăsi neuronii motori şi a induce oxidarea şi tulburări ale captării glutamatului în astrocitele din vecinătate. Drept confirmare, la şoarecii transgenici s-a observat oxidarea crescută a proteinelor în regiunile din proximitatea neuronilor motori.

SELECTIVITATEA AFECTĂRII NEURONULUI MOTOR ÎN SLA

Dacă stressul oxidativ indus de SOD_1 mutante are un rol în patologia SLA, rămâne de explicat de ce numai neuronii motori sunt distruşi într-o boală produsă de o mutaţie a unei gene ubiquitar exprimate. Răspunsul pare să fie susceptibilitatea neuronului motor la moartea celulară indusă de glutamat şi capacitatea lor limitată de neutralizare a calciului. Nu s-a stabilit încă sigur dacă abundenţa expresiei SOD_1 este predictibilă pentru vulnerabilitatea specifică a neuronului motor. Deşi concentraţia ARNm al SOD_1 pare să fie mai mare în neuronii susceptibili, nivelele de proteine SOD_1, deşi crescute, nu par a diferi semnificativ de cele din neuronii nevulnerabili. Totuşi, timpul de semiviaţă al SOD_1 în neuronul motor poate fi mai mare decât a fost ea estimată în culturile celulare, în care stabilitatea enzimei mutante este clar diminuată. Nu s-au efectuat până în prezent studii care să compare capacitatea antioxidantă a neuronului motor cu cea a altor neuroni sau a celulelor astrocitare care înconjură neuronii motori (9).

În concluzie, prezenţa unor leziuni oxidative similare în SLA familială şi SLA sporadică sugerează două posibilităţi:

- mecanismul degenerării neuronului motor poate implica stressul oxidativ, în mod independent de cauza primară, sau
- semnele de alterare oxidativă sunt un epifenomen al morţii neuronului motor, fără a avea o semnificaţie patologică.

Trebuie remarcat că evidenţierea stressului oxidativ în SLA nu e cu nimic specifică acestei boli, modificări în acest sens fiind semnalate şi în boala Alzheimer: creşterea concentraţiei hemoxigenazei-1, creşterea nitrotirozinei, alterarea oxidativă a acizilor nucleici, proteinelor şi lipidelor la nivelul celulelor cerebrale, iar b amiloidul însuşi pare a reprezenta o sursă de ROS. Moartea celulelor nigrale, caracteristică bolii Parkinson, poate fi cel puţin parţial mediată de stressul oxidativ, cu atât mai mult cu cât metabolismul neuroaminelor este cunoscut drept sursă de ROS. Constatări similare s-au făcut în demenţa cu corpi Lewy, miopatia cu corpi de incluzie şi alte boli. Aceasta nu înseamnă că stressul oxidativ este patologic irelevant; el poate fi parte a unei căi finale (chiar dacă secundare) comune, prin care boala degenerativă evoluează (24). Un astfel de raţionament explică dependenţa de vârstă a evoluţiei clinice şi natura progresivă a acestei boli.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. **Bogdanov MB, Ramos LE et al** – Elevated hidroxyl radicals generation in vivo in animal models of ALS. *J Neurochem*, 1998; 71: 1321-1324.
2. **Bruijn LI, Beal MF et al** – Elevated free nytrozine levels in ALS. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999; 94: 7606-7615.
3. **Beckman JS, Carson M et al** – ALS, SOD and peroxynitrite. *Nature*, 2000; 364: 584-589.
4. **Allen S, Heath PR et al** – Analysis of the cytosolic proteome in a cell culture model of familial amyotrophic lateral sclerosis reveals alterations to the proteasome, antioxidant defenses, and nitric oxide synthetic pathways. *J Biol Chem*, 2003; 278(8): 6371-83.
5. **Liu R, Althaus JS et al** – Enhanced oxygen production in a transgenic mouse model of ALS. *Ann Neurol*, 1999; 44: 763-766.
6. **Hyun DH, Lee MH et al** – Proteasomal dysfunction induced by 4-hydroxy-2, 3-trans-nonenal, an end-product of lipid peroxidation: a mechanism contributing to neurodegeration?. *J Neurochem*, 2002; 83(2): 360-70.
7. **Gurney ME, Pu H et al** – Motor neuron degeneration in mice that express a human SOD1 mutation. *Science*, 1998; 264: 1772-1774.
8. **Weishaupt JH, Neusch C et al** – Cyclin-dependent kinase 5 (CDK5) and neuronal cell death. *Cell Tissue Res*, 2003; 312(1):1-8.
9. **Rakhit R, Cunninham P et al** – Oxidation-induced misfolding and aggregation of superoxide dismutase and its implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem*, 2002; 277(49): 47551-6.
10. **Tiwari A, Hayward LJ** – Familial amyotrophic lateral sclerosis mutants copper/zinc superoxide dismutase are susceptible to disulfide reduction. *J Biol Chem*, 2003; 278(8): 5984-92.
11. **Takamiya R, Takahashi M et al** – Glycation proceeds faster in mutated Cu, Zn-superoxide dismutases to familial amyotrophic lateral sclerosis. *FASEB J*, 2003; 17(8): 938-40.
12. **Elam JS, Malek K et al** – An alternative mechanism of bircabonate-mediated peroxidation by copper-zinc superoxide dismutase. *J Biol Chem*, 2003; [epub ahead of print].
13. **Kim SH, Henkel JS et al** – PARP expression is increased in astrocytes but decreased in motor neurons in the spinal cord of sporadic ALS patients. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2003; 62(1): 88-103.
14. **Robertson J, Doroudchi MM et al** – A neurotoxic peripherin splice variant in a mouse of ALS. *J Cell Biol*, 2003; 160(6): 939-49.
15. **Cutler RG, Pedersen WA et al** – Evidence that accumulation of ceramides and cholesterol esters mediates oxidative stress-induced death of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, 2002; 52(4): 448-57.
16. **Patel Y, Collaco Y et al** – Neuroprotective effects of copper/zinc-dependent superoxide dismutase a wide variety of death-inducing stimuli and proapoptotic effect of familial amyotrophic lateral sclerosis mutations. *Brain Res Mol Brain Res*, 2002; 109(1-2): 189-97.
17. **Puttaparthi K, Gitomer WL et al** – Disease progression in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis is dependent on both neuronal and non-neuronal zinc binding proteins. *J Neurosci*, 2003; 23(2): 1a.
18. **Ellis DZ, Rabe J et al** – Global loss of Na, K-ATPase and is nitric oxide-mediated regulation in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci*, 2003; 23(1): 43-51.
19. **Banci L, Felli IC et al** – Direct detection of hydrogen bonds in monomeric superoxide dismutase: biological implications. *Biochemistry*, 2002; 41(9): 2913-20.
20. **Louwerse ES, Weverling EJ et al** – Randomised, double blind controlled trial of acetylcysteine in ALS. *Arch Neurol*, 1995; 52: 559-564.
21. **Menzies FM, Cookson MR et al** – Mitochondrial dysfunction in a cell culture model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*, 2002;125 (Pt 7): 1522-33.
22. **Trotti D, Rolfs A et al** – SOD1 mutants linked to ALS selectively inactivate a glial glutamate transporter. *Nature Neurosci*, 1999; 2: 427-433.
23. **Rao AV, Balachandran B** – Role of oxidative stress and antioxidants in neurodegenerative diseases. *Nutr Neurosci*, 2002; 5(5): 291-309.
24. **Markesberry WR, Carney JM** – Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathol*, 1999.